



10/53701
07 MAR 2005
17 00 15 9

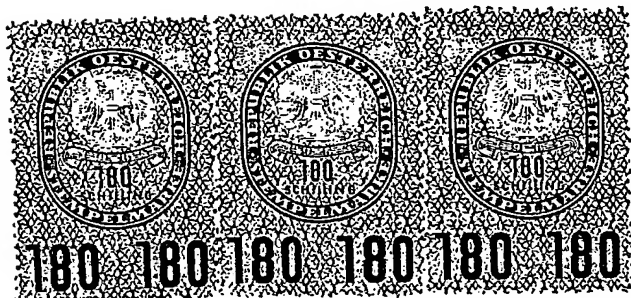
REC'D 07 AUG 2001

WIPO

PCT

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1014 WIEN, KOHLMARKT 8 - 10



Aktenzeichen A 896/2000

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

Dipl.-Ing. Dr. Andreas Kubin
in A-1120 Wien, Erlgasse 48 und
Mag. Hans Günther Loew
in A-1090 Wien, Säulengasse 16,

am **23. Mai 2000** eine Patentanmeldung betreffend

"Neue Präparation von Hypericin gebunden an
Polyvinylpyrrolidon (PVP)",

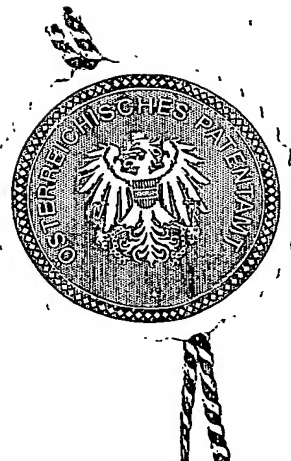
überreicht haben und dass die beigeheftete Beschreibung mit der
ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten
Beschreibung übereinstimmt.

Es wurde beantragt, Dipl.-Ing. Dr. Andreas Kubin in Wien, und
Mag. Hans Günther Loew in Wien, als Erfinder zu nennen.

Österreichisches Patentamt

Wien, am 12. Juni 2001

Der Präsident:



PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

HRNCIR
Fachoberinspektor

BEST AVAILABLE COPY



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Verwaltungsstellen-Direktion

...260,- s 18.89... €

Kanzleigegebühr bezahlt.

Balaram

014952

Urtext

(11) NR.

- 11

Zusammenfassung:

Hypericin, ein Pflanzeninhaltsstoff aus *Hypericum perforatum* (Johanniskraut), wird seit etwa 20 Jahren auf seine Einsatzmöglichkeiten für therapeutische Anwendungen überprüft. Die lipiden und wasserunlöslichen Eigenschaften der Substanz erschweren die Applikation im menschlichen Körper.

Durch die Bindung von Hypericin an Polyvinylpyrrolidon (PVP) kann ein gut wasserlöslicher Komplex dargestellt werden, der für therapeutische und diagnostische Anwendungen geeignet ist.

Die wasserlösliche Wirkstoffkombination kann beispielsweise zur Durchführung der photophysikalischen bzw. photodynamischen Diagnostik (PPD bzw. PDD) und der photodynamischen Therapie (PDT) eingesetzt werden.

Nach selektiver Bindung des Komplexes an Läsionen humanen Gewebes wird mit elektromagnetischer Strahlung (Licht) oder Ultraschall der Farbstoff angeregt und der physikalische bzw. chemische Response zur Diagnostik bzw. zur Therapie genützt.

Die Wirkstoffkombination ist folgendermassen zusammengesetzt:

der Photosensibilisator Hypericin aus *Hypericum perforatum* (oder synthetisches Hypericin etwa aus Emodin synthetisiert) gebunden oder komplexiert an Polyvinylpyrrolidon (PVP) verschiedenen Polymerisations- und Vernetzungsgrades. Dadurch kann der ansonsten wasserunlösliche Farbstoff Hypericin zu verschiedenen therapeutischen Zwecken in wässriger Form verabreicht werden.

Beschreibung:

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine wässrige Lösung des Pflanzeninhaltsstoffes Hypericin durch Bindung an Polyvinylpyrrolidon (PVP) verschiedenen Polymerisations- und Vernetzungsgrades zur Verwendung für therapeutische oder diagnostische Anwendungen, wie zum Beispiel als Photosensitizer in der photodynamischen Therapie und photophysikalische Diagnostik.

Hypericin, ein Pflanzeninhaltsstoff aus *Hypericum perforatum* gilt als vielversprechender Sensitizer, dessen photodynamische Effektivität *in vitro* mehrfach nachgewiesen werden konnte [Literatur 7 – 14]. Besonders für die systemische Applikation grösserer Mengen (bis 5 mg / kg KG) fehlt bis heute die entsprechende wässrige Verabreichungsform.

In den letzten 25 Jahren entwickelte sich die selektive Photosensibilisierung von malignen Geweben, oder Gewebeerkrankungen anderer Art zu einem eigenständigen medizinischen Gebiet [1, 2, 6]. Darin finden insbesondere zwei Methoden klinische Anwendung [3]:

- Ausnutzung physikalischer Effekte (zB. lichtinduzierte Fluoreszenz) zur Diagnose (Photophysikalische Diagnose (PPD))
- Ausnutzung der lichtinduzierten photodynamischen Prozesse als Therapieform (Photodynamische Therapie (PDT))

Die Entwicklung der PDT und PPD zeigt heute einen progressiven Verlauf. Seit 1992 hat sich der monatliche Output an wissenschaftlichen Publikationen nahezu verdreifacht (Current Contents: Life Sciences). Dieses Faktum ist einerseits darauf zurückzuführen, daß sich die PDT als effektive Tumorthherapie erwiesen hat und andererseits auch für nichtmaligne Erkrankungen wie zB. Gefäß-, Viruserkrankungen Anwendung findet.

PDT und PPD bedienen sich Mechanismen, die der Wechselwirkung zwischen Licht und Gewebe zugrundeliegen. Vermittler dieser Wechselwirkungen sind ein geeigneter Photosensitizer und Sauerstoff. So ergeben sich vier Einflußbereiche -

Licht, Sensitizer, Sauerstoff und Gewebematrix (physikalisch-optische und chemische Gewebebeschaffenheit [4, 5]), deren Zusammenwirken die zielführende Anwendung von PDT und PPD ermöglicht. Photosensitizer, die geringe systemische Toxizität aufweisen und sich im Idealfall im malignen Tumor anreichern, werden verabreicht. Darauf folgende Belichtung mit sichtbarem Licht induziert photochemische Reaktionen vor allem vom Typ II, aber auch Typ I, die weitgehend eine Zerstörung von Biomembranen, Biomolekülen und subzellulären Organellen hervorrufen [3].

Diese Reaktionen werden therapeutisch in der photodynamischen Tumorthherapie genutzt, in dem cytotoxische Reaktanden der aktivierten Photosensitizer Tumorzellen zerstören. Weiters können in malignen Läsionen angereicherte Sensitizer über ihr Fluoreszenzlicht zu diagnostischen Methoden etabliert werden.

Die vorliegende Erfindung befaßt sich mit einer neuen Verabreichungsform von Sensitizern (Hypericin komplexiert mit PVP = Farbstoffkomplex) zur Diagnostik oder Behandlung von malignen aber auch nichtmalignen Erkrankungen.

Erfindungsgemäß ist ein solches Heilmittel folgendermassen zu einem Farbstoffkomplex zusammengesetzt:

- **Hypericin (aus *Hypericum perforatum* isoliert, oder synthetisiert zB. Aus Emodin):**
- **in wässriger Lösung (etwa physiolog. Kochsalzlösung) und**
- **Polyvinylpyrrolidon (PVP)**

Durch PVP ist es möglich den wasserunlöslichen Sensitizer Hypericin in wässriger Lösung zu verabreichen. Dadurch ist die Verwendung von stark gewebeirritierenden organischen Lösungsmitteln vermeidbar und eine physiologisch günstige Applikationsform für verschiedenste diagnostische und therapeutische Anwendungen darstellbar..

Je nach Anwendungsbereich liegen etwa folgende Konzentrationen der Komplexverbindung vor:

Hypericin von 1 $\mu\text{Mol/l}$ bis 0,1 Mol/l

PVP von 1 $\mu\text{Mol/l}$ bis 0,1 Mol/l

Das molare Verhältnis von PVP zu Hypericin ist abhängig vom Polymerisations- und Vernetzungsgrades des Poly-N-Vinylamides. Je kleiner die molare Masse von PVP, desto höher muss dessen Konzentration im Verhältnis zu Hypericin vorliegen, um den Sensitizer vollständig zu lösen.

Bei topischer Verabreichung ist auf Grund der geringeren Diffusionsgeschwindigkeit die Konzentration von Hypericin noch höher anzusetzen.

Die erste Ausgestaltung dieses Verfahrens besteht darin, daß aktivierbare Komplexe bzw. Verbindungen hergestellt werden, die sich aus Hypericin zusammensetzt, das komplexiert oder kovalent gebunden ist an Polyvinylpyrrolidone verschiedenen

Polymerisationsgrades. Abbildung 1 zeigt die zeitabhängige Löslichkeit von Hypericin nach Komplexierung durch PVP. Ohne PVP zeigt sich keine Absorption im relevanten Spektralbereich. Erst nach Zugabe von PVP entsteht das typische Absorptionsspektrum von Hypericin (max 600 nm) durch Lösung dieses Farbstoffes im wässrigen Medium.

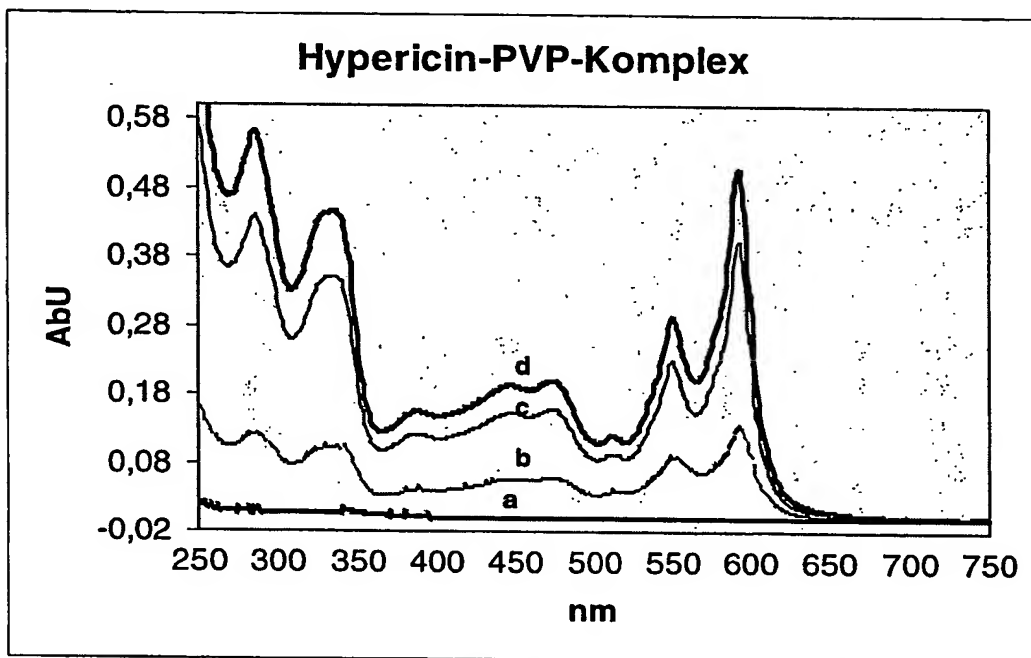


Abbildung 1: Photometrischer Nachweis der Löslichkeit von Hypericin in Wasser nach Komplexierung durch PVP. a) Hypericin ohne PVP. b) Hypericin + PVP nach 30 Minuten. c) Hypericin + PVP nach 60 Minuten. d) Hypericin + PVP nach 180 Minuten.

Hypericin bildet in wässriger Umgebung sofort unlösliche Aggregate, die ausfallen und vor allem keine Fluoreszenz mehr zeigen (siehe Diwu Z. et al. [14]). Die vorliegende Lösung von Hypericin-PVP zeigt das typische Absorptionsspektrum und emittiert Fluoreszenzlicht bei etwa 600 nm Wellenlänge. Dies zeigt, dass Hypericin in gelöster Form vorliegt (Hypericin in aggregierter oder mikrodispersiver Form emittiert nach Anregung kein Fluoreszenzlicht).

Es hat sich herausgestellt, daß durch die Bindung von Hypericin an PVP eine wasserlösliche Form des Farbstoffes zur Verfügung steht, die leicht applizierbar ist und eine bessere Verteilung der Sensitizer und verbesserte Anreicherung und Selektivität in pathologischem Gewebe erreicht werden kann.

Bevorzugt werden als Träger Polyvinylpyrrolidone (PVP) mit einem Polymerisationsgrad von niedrigeren Molmassen (10.000 - 90.000 g/Mol), da diese durch Zellmembranen diffundieren können und ausscheidbar sind. PVP komplexieren Farbstoffe und es stellte sich in Experimenten heraus, daß auch lipophile Farbstoffe wie Hypericin so in wässrige Lösung gebracht werden können. Läsionen in der Blase (durch Spülung) konnten so angefärbt und über Fluoreszenzlicht nach Anregung erfolgreich detektiert werden. Nach Bedarf kann der Polymerisationsgrad von PVP auch höher festgelegt werden.

Verwendung finden diese PVPs als Blutserumersatz, künstliche Tränenflüssigkeit, zur Entgiftung und als Tablettenbinde- und Überzugsmittel (orale Anwendung). Als Blutserumersatz werden heute jedoch überwiegend Dextrane, Gelatine-Stärke-Derivate und Serumproteinlösungen verwendet, die ebenfalls Farbstoffe komplexieren können und in dem hier Beschriebenen Verfahren zum Einsatz kommen können. Durch die Verwendung dieser unterschiedlichen Lösungsvermittler, wird auch die Gewebeselektivität und -affinität verändert und kann somit zu einer selektiveren Anreicherung im entsprechenden Gewebe begünstigen.

Die Hypericinkomplexe werden bei systemischer Anwendung etwa 0,1 bis 36 Stunden vor der Behandlung verabreicht. Dabei erwiesen sich Dosierungen der Sensitizer von 0,1 mg bis 5,0 mg pro kg Körpergewicht als günstig. Die Anreicherung im Zielgewebe wird nach herkömmlichen Methoden (Fluoreszenzspektroskopie) bestimmt.

Geeignet zur Behandlung sind vor allem Tumore und Läsionen auf und unter der Haut, wie auch in Kavitäten und Lumina oder tiefer liegenden Gewebeteilen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es die zur Anregung erforderliche Lichtenergie (elektromagnetische Strahlung) mittels Lichtwellenleiter in das Zielgewebe zu bringen. In kavitären Regionen (Hohlräumen wie auch die Blase)

kann durch Spülung des Gewebes auch mit höher molekularem PVP die Diffusion des Farbstoffkomplexes in die Läsionen ermöglicht werden. Hierbei wird auch die Wirkung des Ultraschalls auf die biologischen Transportvorgänge hervorgehoben.

Der Transport der Farbstoffkomplexe soll über die Gefäße oder durch Diffusion durch Haut und/oder Gewebe zu den Läsionen erfolgen, wo eine selektive Anreicherung der Komplexe aufgrund unterschiedlicher Morphologie und Physiologie beispielsweise von Tumoren stattfinden soll. Nichtphysiologische (pathologische) Vorgänge im Organismus umfassen sowohl gutartige wie auch bösartige Erkrankungen. All diese Erkrankungen zeichnen sich durch erhöhten Stoffwechsel aus. Auf Grund auch dieser Tatsache lagert sich der Farbstoffkomplex bevorzugt in diesen Körperregionen an. Dadurch ist eine erhöhte Sensibilisierung des erkrankten Gewebeareals zu erzielen.

Die genannten Verbindungen reichern sich also sowohl in malignen als auch in benignen Läsionen an, nicht aber in gesundem Gewebe. Dadurch ist die Detektion von Läsionen über emittiertes Fluoreszenzlicht möglich (Diagnostik). Die selektive Sensibilisierung ermöglicht weiters die therapeutische Behandlung (photodynamische Therapie).

und werden dort mittels Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt. Auch eine Kombination Ultraschall-Licht gewährleistet ein breiteres Anregungsspektrum und eröffnet eine selektivere Behandlungsform von malignen Gewebearealen und anderen Läsionen, die sich im Schnittpunkt der beiden physikalischen Energieeinträge befinden - wodurch umliegendes Gewebe von der Behandlung mehr oder weniger unbeeinträchtigt bleibt.

Wenn bei der ersten erfindungsgemäßen Behandlung nicht die vollständige Entfernung malignen oder pathologischen Gewebes erreicht werden kann, ist eine Wiederholung der Therapie möglich. Es wird gegebenenfalls sodann mehrmals, im Abstand von einigen Wochen nachbehandelt.

Patentansprüche

1. Neue Substanz (Wirkstoffkombination) dadurch gekennzeichnet, dass Hypericin an Polyvinylpyrrolidon (PVP) gebunden oder komplexiert wird. Durch die Komplexierung des wasserunlöslichen therapeutisch wirksamen Pflanzeninhaltsstoffes Hypericin können wasserlösliche Präparationen für diagnostische Methoden und neue Arzneimittel hergestellt werden.
2. Anwendung gekennzeichnet durch die Verwendung der neuen wasserlöslichen Wirkstoffkombination nach Anspruch 1 für therapeutische und diagnostische Methoden, etwa zur Behandlung von Tumoren und krankem Gewebe unter Durchführung der photophysikalischen bzw. photodynamischen Diagnostik bzw. Krebsfrüherkennung (PPD bzw. PDD) und der photodynamischen Therapie (PDT).
3. Die Wirkstoffkombination nach Anspruch 1 bis 2 dadurch gekennzeichnet dass der **Photosensibilisator Hypericin** gebunden beziehungsweise komplexiert an **Polyvinylpyrrolidon (PVP)** verschiedenen Polymerisations- und Vernetzungsgrades ist, vor allem aber an Verbindungen der Gruppe der Poly-N-vinylamide.
4. Anwendung nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur medizinische Behandlung die photosensibilisierende Substanz Hypericin verwendet wird, die gebunden oder komplexiert von Polyvinylpyrrolidon verschiedenen Polymerisationsgrades in wässriger Lösung verabreicht werden kann.
5. Anwendung nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass zur besseren physiologischen Verträglichkeit und Erhöhung der Stabilität die wässrige Lösung auch entsprechend abgepuffert werden kann, beziehungsweise durch Kochsalz auf den therapeutisch günstigen osmotischen Druck eingestellt werden kann
6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Komplexe in wässriger Lösung intravenös, intrakavitär, oral, intraperitoneal oder inhalativ verabreicht werden, oder mit hydrophilen oder hydrophoben Trägerstoff (Creme, Gel, Aerosol, Pflaster etc.) aufgetragen werden.

7. Anwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Komplexe nach Verabreichung und einer Inkubationszeit von etwa 0,1 bis 36 Stunden mit elektromagnetischer Strahlung und/oder fokussiertem Ultraschall (bei Bedarf auch länger) aktiviert werden.

8. Anwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Aktivierung der Komplexe zur therapeutischen oder diagnostischen Anwendung im Zielgewebe durch Licht vorzugsweise im Wellenlängenbereich von 320 bis 800 nm, kohärent oder inkohärent und durch Ultraschall vorzugsweise fokussiert und etwa 1,5 Mhz, vorgenommen wird.

9. Substanz nach Anspruch 1 bis 8 dadurch gekennzeichnet, dass Hypericin gebunden, angelagert oder komplexiert wird, vor allem mit Polyvinylpyrrolidon, aber auch mit anderen Komplexbildnern wie Dextrane, Gelatine-Stärke-Derivate, Serumproteine, perfluorierte Verbindungen und andere, die eine Applikation von Hypericin in wässrige Lösung ermöglichen.

LITERATUR

- [1] DOUGHERTY T.J., MARCUS S.L.,
Photodynamic Therapy.
Eur J Cancer, 28 (1992) 1734-1742
- [2] HILLEGERSBERG R., KORT W.J., WILSON J.H.P.,
Current Status of Photodynamic Therapy in Oncology.
Drugs, 48 (1994) 510-527
- [3] SROKA R.,
In-vivo Untersuchung Modifizierter Photosensibilisatoren und Entwicklung von
Lichtapplikationssystemen für die PDT.
Akademischer Verlag München, 1992
- [4] BHATTA N., ISAACSON K., BHATTA K.M., ANDERSON R.R., SCHIFF I.,
Comparative study of different laser systems
Fertility and Sterility, 1994, 61, 4; 581-591
- [5] BOCK G., HARNETT S.,
Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use.
Ciba Foundation Symposium 146
John Wiley & Sons, 1989
- [6] HENDERSON B.W., DOUGHERTY T.J.
How does photodynamic therapy work
Photochem. Photobiol. 55 (1992) 145 - 157
- [7] KUBIN A., ALTH G., JINDRA R., JESSNER G., EBERMANN R.
Wavelength dependent photoresponse of biological and aqueous model
systems using the photodynamic plant pigment hypericin.
J. Photochem. Photobiol. B: Biology 36 (1996) 103 - 108
- [8] THOMAS C., PARDINI R. S.
Oxygen Dependence of Hypericin-induced Phototoxicity to EMT6 Mouse
Mammary Carcinoma Cells
Photochemistry Photobiology, Vol. 55, No. 6, pp. 831-837, 1992
- [9] KNOX J.P., DODGE A.D.
Isolation and activity of the photodynamic pigment hypericin
Plant, Cell and Environment 8 (1985), 19 - 25
- [10] DURAN N., SONG P.S.,
Hypericin and its Photodynamic action,
Photochemistry and Photobiology, Yearly Review, Vol. 43, No. 6, pp. 677-680,
1986
- [11] VANDENBOGAERDE AL., CUVEELE JF., PROOT P., HIMPENS BE.,
MERLEVEDE WJ., deWITTE PA.
Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin.
J Photochem. Photobiol. B: Biology 38 (1997) 136-142
- [12] KNOX JP., DODGE AD.
Isolation and activity of the photodynamic pigment hypericin
Plant Cell and Environment 8 (1985) 19-25
- [13] ANDREONI A., COLASANTI A., COLASANTI P., MASTROCINQUE M., RICCIO
P., ROBERTI G.
Laser photosensitization of cells by hypericin
Photochem. Photobiol. 59 (1994) 529-533
- [14] DIWU Z.
Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins
Photochem. Photobiol. 61 (1995) 529-539

Weiterführende Literatur

- [15] HESSE M., MEIER H., ZEEH B.,
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie,
G. Thieme Vlg. Stuttgart New York 1984, pp. 1 - 32.
- [16] ELSTNER E.F.,
Der Sauerstoff
Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich 1990, Band I
- [17] YOUNG S.W., QING F., et al.
Gadolinium(III)texaphyrin: A tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (1996) pp. 6610 - 6615
- [18] NITZAN Y, GUTTERMAN M, MALIK Z, EHRENBURG B.
Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins.
Photochem. Photobiol. 55, 1992, 89-96
- [19] HILL J.S., KAHL S.B., STYLLI S.S., NAKAMURA Y., KOO M.S., KAYE A.H.,
Selective tumor kill of cerebral glioma by photodynamic therapy using a boronated porphyrin photosensitizer.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 12126 - 12130
- [20] SZEIMIES R.M., CALZAVARA PINTON PG., KARRER S., ORTEL B.,
LANDTHALER M.
Topical photodynamic therapy in dermatology.
J. Photochem. Photobiol. B: Biology 36 (1996) 213 - 219
- [21] PENG Q., WARLOE T., et al.
Distribution of 5-Aminolevulinic acid-induced Porphyrins in nodulocutaneous basal cell carcinoma.
Photochem. Photobiol. 62 (1995) 906 - 913
- [22] BRAICHOTTE D., SAVARY JF., GLANZMANN T., WESTERMANN P., FOLLI S.,
WAGNIERES G., MONNIER P., VAN DEN BERGH H.,
Clinical pharmacokinetic studies of tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorin in squamous cell carcinoma by fluorescence spectroscopy at 2 wavelengths.
Int. J. Cancer 63 (1995) 198 - 204
- [23] SUSLICK KS.
Die chemische Wirkung von Ultraschall
Spektrum der Wissenschaften, 4 (1989) 60 – 66